昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, December 2012, 55(12): 1406 – 1412 ISSN 0454-6296

Bt 毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选

符 伟[1,2,3], 谢 文[3], 张 卓[2], 吴青君[3], 王少丽[3], 张友军[3,*]
(1. 湖南农业大学农药研究所, 长沙 410128; 2. 湖南省植物保护研究所, 长沙 410125;
3. 中国农业科学院蔬菜与花卉研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】筛选出 Bt 毒素诱导后的小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)的实时定量 PCR 最适内参基因。【方法】选取核糖体 18S rRNA (18S rRNA)、肌动蛋白(ACTB)、延伸因子(EF1)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、核糖体蛋白 L32 (RPL32)、核糖体蛋白 S13 (RPS13)、核糖体蛋白 S20 (RPS20)和 β-微管蛋白(TUB)基因作为候选内参基因,以 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 软件分析这 8 个基因在 Bt 毒素诱导后的小菜蛾不同品系中肠组织中的表达稳定性。并应用筛选出来的内参基因分析小菜蛾氨肽酶 2(aminopeptidase N2, APN2)基因的表达水平。【结果】geNorm 软件以 *RPS*13 和 *EF*1 为最稳定内参基因, NormFinder 和 BestKeeper 软件均以 *RPS*13 和 *RPL*32 为最稳定基因。使用 3 种不同内参基因分析 Bt 毒素诱导后的小菜蛾 Bt 抗性和敏感品系中 *ANP*2 表达水平时, 新的内参基因 *EF*1 和传统内参基因 *RPL*32 表现了良好的稳定性, 二者作为标准化因子, *ANP*2 表达量结果基本一致, 而使用 18S rRNA 作为内参基因, 却导致部分表达量分析结果有所误差。【结论】筛选出 *PRS*13, *RPL*32 和 *EF*1 可以作为小菜蛾某些试验条件下的内参基因, 对小菜蛾基因表达研究奠定了一定基础, 也对其他昆虫内参基因的筛选具有参考价值。

关键词: 小菜蛾; 实时定量 PCR; 内参基因; 抗药性; Bt 毒素
中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2012)12-1406-07

Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to Bt toxin

FU Wei[1,2,3], XIE Wen[3], ZHANG Zhuo[2], WU Qing-Jun[3], WANG Shao-Li[3], ZHANG You-Jun[3,*] (1. Institute of Pesticide Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Plant Protection Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; 3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract:【Aim】To select the suitable reference genes in *Plutella xylostella* after exposure to Bt toxin by quantitative real-time PCR.【Methods】Eight candidate reference genes, including 18S ribosomal RNA (18S rRNA), beta actin gene (*ACTB*), elongation factor 1 gene (*EF*1), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*), ribosomal protein L32 gene (*RPL*32), ribosomal protein S13 gene (*RPS*13), ribosomal protein S20 gene (*RPS*20), and β-tubulin gene (*TUB*), were chosen. The stability of these candidate reference genes was investigated using three softwares (geNorm, NormFinder and BestKeeper). Then, the expression of aminopeptidase N2 gene (*APN*2) was analyzed by using different reference genes.【Results】Based on the results of geNorm analysis *RPS*13 and *EF*1 were the most suitable reference genes in *P. xylostella* after exposure to the Bt toxin Cry1Ac, while based on the results of the NormFinder and BestKeeper analysis *RPS*13 and *RPL*32 were the most suitable reference genes. Using new reference gene (*EF*1) or traditional reference gene (*RPL*32) for normalization, similar expression levels of *APN*2 were observed, whereas normalization with the unstable reference gene (18S rRNA) might lead to erroneous interpretations.【Conclusion】This work is contributable to the solid foundation for future gene expression studies in the diamondback moth, and may also serve as a resource

基金项目: "十二五"科技支撑计划课题(2012BAD19B06); 农业部公益性行业专项(201103021); 蔬菜有害生物控制与优质栽培北京市重点实验室项目; 园艺作物病虫害治理湖南省重点实验室项目
作者简介: 符伟, 男, 1980 年生, 湖南湘西人, 博士, 助理研究员, 研究方向为昆虫生态及分子生物学, E-mail: fuwei@hnppi.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyj@mail.caas.net.cn
收稿日期 Received: 2012-08-27; 接受日期 Accepted: 2012-12-02

to screen reference genes for expression studies in other insects.
Key words: *Plutella xylostella*; quantitative real-time PCR; reference gene; resistance; Bt toxin

小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）是世界性害虫，严重危害十字花科蔬菜的产量和品质（Talekar and Shelton, 1993），对多种杀虫剂产生抗药性，极大增加其防控难度（冯夏等，2011）。苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*，简称 Bt）能产生杀虫晶体蛋白，不但可以作为微生物农药，亦可导入植物体内形成转 Bt 基因作物，广泛应用于害虫防治。但是小菜蛾亦能对其产生抗药性，并且是目前唯一发现田间种群对 Bt 毒素产生抗药性的害虫。

近年来，与小菜蛾相关的研究（尤其是抗药性机理研究），大多深入到基因水平。众多分子技术中，实时定量 PCR 是研究基因表达水平目前最有效的手段（Bustin *et al*., 2005）。为了保证目标基因表达水平实时定量 PCR 结果的准确性，引入了内参基因作为参照（Derveaux *et al*., 2010）。理想的内参基因应在各种实验条件下，其表达水平不应发生太大变化，但是，实际中很多传统的内参基因（如 18S rRNA），在某些实验条件表达水平变异很大，不宜作为内参基因使用。因此在进行定量 PCR 实验之前，应该对其所用内参基因的稳定性进行评价，而用于评价内参基因稳定性的软件，如 GeNorm，NormFinder 和 BestKeeper 也应运而生。本研究正是应用此 3 种软件，对 Bt 毒素诱导后的小菜蛾的实时定量 PCR 分析中 8 种候选内参基因（包括目前文献中已报道的小菜蛾实时荧光定量 PCR 所用的 6 种内参基因和 2 种从未在小菜蛾实时荧光定量 PCR 作为内参使用过的基因）的稳定性进行了综合评价。随着小菜蛾转录组测序等工作的完成，荧光定量 PCR 技术是研究新基因功能的重要手段之一（He *et al*., 2012），本研究为以后小菜蛾相关基因表达水平研究关于内参基因的选择提供一定参考依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

小菜蛾敏感品系和抗性品系均为美国康奈尔大学赵建周研究员惠赠，其中敏感品系室内饲养多年，期间从未接触过任何药剂，而抗性品系最初于室内以转 Cry1Ac 基因甘蓝选育约 300 代，自 2003 年后以甘蓝苗浸渍 Cry1Ac 毒素蛋白室内汰选，抗性接近 1 000 倍。实验共分 4 组：分别为抗性和敏感品系 3 龄幼虫用浸有 Cry1Ac 毒素蛋白的甘蓝叶片饲喂 48 h，而未处理的 2 个品系的 3 龄幼虫作为对照组，每组收集存活的 15 头虫体中肠组织用以总 RNA 的提取，每组重复 3 次。

1.2　主要试剂

Bt 毒素为 Cry1Ac 晶体蛋白，由中国农业科学院植物保护研究所张杰研究员课题组提供；Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司；逆转录试剂盒（PrimeScript® RT Reagent Kit）购自日本 TaKaRa 公司；荧光定量 PCR 试剂盒（SYBR Green RealMasterMix）购自北京天根公司；其他试剂均为国产分析纯产品；荧光定量 PCR 仪（ABI 7500 型）为美国 ABI 公司产品。

1.3　引物的设计及合成

参考 GenBank 中小菜蛾相应基因的核苷酸序列，采用 ABI 公司 Primer Premier 5.0 软件设计引物，上海生工（北京）公司合成，详见表 1。

1.4　总 RNA 提取与 cDNA 合成

将上述 4 组样品分别加入 Trizol 试剂，按照试剂操作说明进行小菜蛾中肠组织总 RNA 提取。通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测所得总 RNA 的质量和浓度。每组重复 3 次，均以 20 μL 体系 1 μg RNA 的量按照反转录试剂盒说明进行 cDNA 合成。

1.5　实时荧光定量 PCR

1.5.1　扩增效率分析：利用敏感品系未处理组 cDNA 为模板，进行 5 倍稀释，共设 6 个实验浓度；分别对 8 个内参基因和 *APN*2 进行荧光定量 PCR，构建标准曲线，参照 Pfaffl（2001）计算扩增效率和 R^2，$E = (10^{[-1/slope]} - 1) \times 100$。

1.5.2　PCR 片段序列分析：将 PCR 扩增产物进行亚克隆，送 TaKaRa 公司测序，并用 DNAstar 5.0 进行序列分析。

1.5.3　荧光定量 PCR：取上述 4 ng 逆转录产物（cDNA）进行荧光定量 PCR，按照荧光定量 PCR 试剂盒的说明书进行，每个样品重复 4 次，每组 3 个重复。反应体系为 25 μL，包括 12.5 μL Real Master Mix 混合液，10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL，加无 RNA 酶的水 10.5 μL。反应条件：95℃ 预变性 3 min；95℃ 30 s，60℃

30 s，72℃ 35 s，共 40 个循环。反应结束后确认 real-time PCR 反应的扩增曲线和熔解曲线。

1.6 内参基因稳定性验证

分别选用稳定性不同的 3 个内参基因（*EF*1，*RPL*32 和 18S rRNA）分析上述 4 个处理样品中小菜蛾 *ANP*2 的表达水平。

1.7 数据处理和分析

数据分析采用 Excel 2003 和 3 种常用内参稳定评价软件 geNorm（Vandesompele *et al*.，2002），NormFinder（Andersen *et al*.，2004）和 BestKeeper（Pfaffl *et al*.，2004）参照其说明进行分析。具体操作为：Excel 2003 中将不同样本中某一内参基因 Ct 值最小者对应样品的表达量定义为 1，其他样品此内参基因的相对表达量则为 $2^{\Delta Ct}$（ΔCt = 各样本 Ct 值 - 最小 Ct 值），将这些数据导入 geNorm 程序在进行数据格式转换后通过 Change Data 命令利用 geNorm 程序计算基因表达稳定度 M 值，对内参基因的表达稳定度进行排序（M 值越小则表达越稳定），最后根据内参基因标准化因子的配对差异分析（Vn/n + 1）判定内参基因的最适数目。NormFinder 与 geNorm 类似，仍需进行原始数据的 $2^{\Delta Ct}$ 转化后进行运算，而 BestKeeper 输入原始数据即可。计算相对表达量的数据方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法（Pfaffl，2001），并用 Tukey 氏检验分析各处理间差异显著性。

表 1 荧光定量引物信息

Table 1 Information of the primers used for real-time PCR

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列（5′-3′） Primer sequences	扩增片段（bp） Amplicon size	序列一致性（%） Identity	扩增效率（%） Amplification efficiency	R^2
18S rRNA	AY371192	F：GTTGTTGGGAAGTTGACC R：CAGTGCGGCATTCAGT	187	99	96.5	0.991
ACTB	AB282645	F：GCGACTTGACCGACTACCT R：GCCGCAAGATTCCATACCC	272	100	102.8	0.999
*EF*1	EF417849	F：GCCTCCCTACAGCGAATC R：CCTTGAACCAGGGCATCT	161	97	111.1	0.995
GAPDH	AJ489521	F：GCCACCACTGCCACTC R：CGGGACGGGAACACG	177	99	112.8	0.997
*RPL*32	AB180441	F：CCAATTTACCGCCCTACC R：TACCCTGTTGTCAATACCTCT	120	99	102.8	0.996
*RPS*13	AY174891	F：TCAGGCTTATTCTCGTCG R：GCTGTGCTGGATTCGTAC	100	99	96.4	0.995
*RPS*20	AB180449	F：GCCCACCAAGTTCCTGC R：ATCTCCGAGGGCGAGTG	123	98	96.3	0.995
TUB	EU127912	F：TGTCTGCCACCTTTATCG R：CCGCCTCTGTGAACTCCATC	147	98	96.1	0.997
*APN*2	GU479677	F：TGATAACGGAGATGCTAA R：CATTTCGTCAGTGGAGGG	102	100	102.3	0.998

2 结果

2.1 小菜蛾实时定量 PCR 分析中候选内参基因的表达水平

8 个候选内参基因 PCR 扩增产物测序结果与对应 GenBank 登录序列的一致性均高于 97%，通过构建 8 个基因的标准曲线，得出扩增效率为 96% ~ 113%，并且 R^2 值均在 99% 以上，说明标准曲线线性关系很好（表 1）。引物特异性主要依据溶解曲线是否为单一峰，本研究中 8 个基因溶解曲线均为单一峰，即无非特异性荧光，因而定量准确。各候选内参基因表达水平变化情况见图 1，由图 1 可知，以 *EF*1 和 *ACTB* 平均表达丰度最高（Ct 值最小），Ct 值变化范围最小的基因是 *EF*1，*RPL*32 和 *RPS*13，而变化范围最大的基因是 18S rRNA 和 *TUB*。

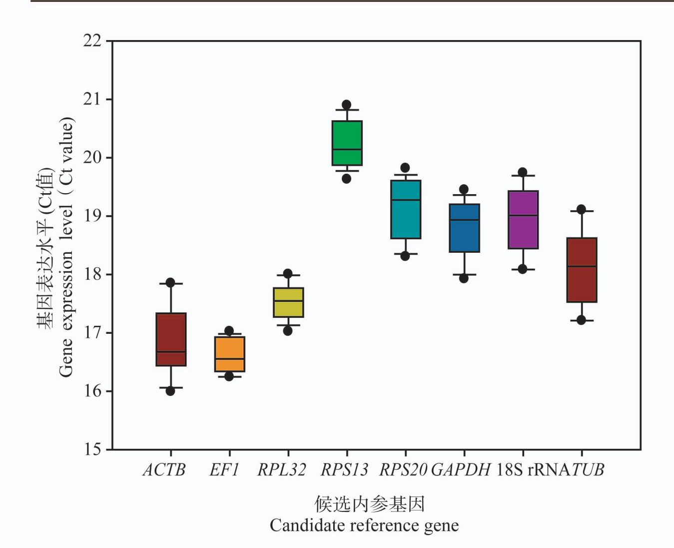


图 1　小菜蛾实时定量 PCR 分析中各候选基因的表达水平

Fig. 1　Expression levels of candidate reference genes in *Plutella xylostella* in quantitative real time PCR

图中数据为平均值 ± 标准误。Data in the figure are mean ± *SE*.

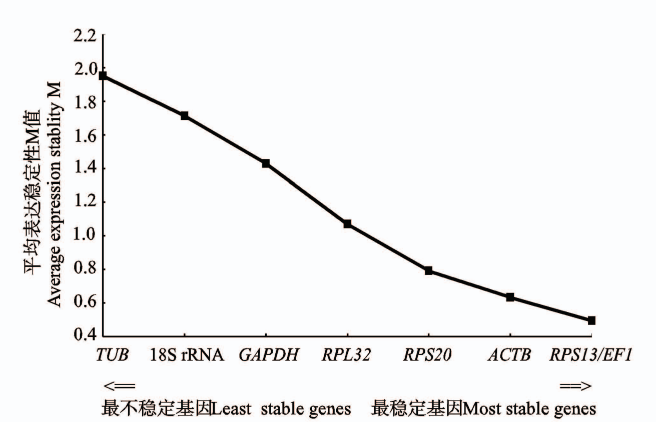


图 2　利用 geNorm 评价 8 种内参候选基因在 Bt 毒素诱导后的小菜蛾中肠组织中的稳定性

Fig. 2　Average expression stability values (M) of the candidate reference genes in midgut of *Plutella xylostella* after exposure to Bt toxin analyzed by geNorm

geNorm 软件中平均表达稳定性 M 值越低表示该基因表达越稳定。A lower M value indicates more stable expression, as analyzed by the geNorm software.

2.2　小菜蛾实时定量 PCR 分析中候选内参基因的稳定性分析

2.2.1　geNorm 结果：Bt 毒素诱导后的小菜蛾中肠组织中 8 种候选内参基因的稳定性见图 2。表达最稳定的是 *EF*1 和 *RPS*13，其平均表达稳定性 M 值在 0.5。其次是 *ACTB*，RPS20，*RPL*32 和 *GAPDH*。这些基因的 M 值均低于 1.5，在此条件下可作为内参基因使用，而 18S rRNA 和 *TUB* 基因 M 值高于 1.5，在此条件不推荐作为内参基因使用。关于内参基因数目的判定，geNorm 软件以标准化因子配对差异(pairwise variations)值 0.15 默认为取舍值，即当 Vn/n + 1 < 0.15 时，说明没有必要选择使用数量大于 n + 1 的看家基因作为内参。虽然本研究中标准化因子配对差异值(Vn/n + 1)均 > 0.15，但是以 V2/3 最小，即在此之后增加更多的内参基因也不能降低标准化因子配对差异值(Vn/n + 1)，亦可认为使用 2 个最稳定的基因(*EF*1 和 *RPS*13)即可(图 3)。

2.2.2　NormFinder 结果：Bt 毒素诱导后的小菜蛾中肠组织中 8 种候选内参基因稳定性见图 4。NormFinder 结果与 geNorm 结果基本一致，*RPS*13 仍是最稳定基因，18S rRNA 和 *TUB* 为最不稳定基因，不同的是 *EF*1 稳定性排在 *RPL*32 之后。

2.2.3　BestKeeper 结果：Bt 毒素诱导后的小菜蛾中肠组织中 8 种候选内参基因稳定性见表 2。BestKeeper 是以标准差(*SD*)与调节系数标准差 *SD* [± x-fold]评判基因表达稳定性，其值越小表示越稳定，与 geNorm 和 NormFinder 结果不同的是，BestKeeper 以 *RPL*32 为最稳定内参基因，但是 *RPS*13 和 *EF*1 仍排列在前 3 名。最不稳定内参基因为 *TUB* 和 *GAPDH*。

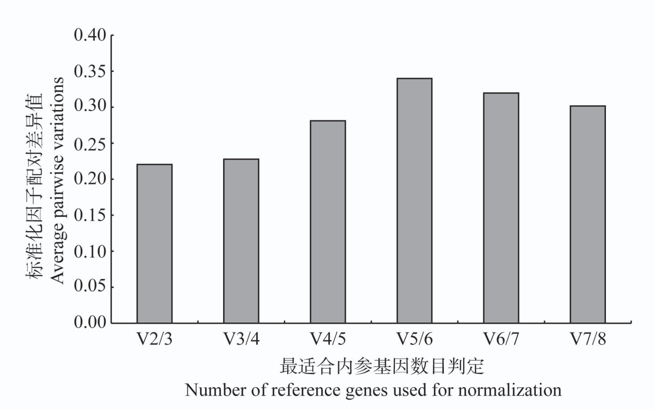


图 3　利用 geNorm 评价 Bt 毒素诱导后的小菜蛾中内参基因的最适数目

Fig. 3　Optimal number of reference genes in *Plutella xylostella* after exposure to Bt toxin for normalization evaluated by geNorm

平均标准化因子配对差异值 Vn/n + 1 可以判断是否需要使用数量≥(n + 1)个内参基因的必要性。Average pairwise variations are calculated between the normalization factors NF_n and NF_{n+1} to indicate whether inclusion of extra reference gene adds to the stability of the normalization factor.

2.3　内参基因稳定性验证

为验证已筛选的内参基因稳定性，选择了小菜蛾稳定性较好的 *RPL*32(小菜蛾常用内参基因)和 *EF*1 (小菜蛾新的内参基因)，以及稳定性较差的

表 2 利用 BestKeeper 软件评价 8 种内参候选基因在 Bt 毒素诱导后的小菜蛾中肠组织中的稳定性

Table 2 Summary statistics generated by the BestKeeper analysis for candidate reference genes in the midgut of *Plutella xylostella* after exposure to Bt toxin based on quantification cycle values (Cq)

参数 Parameters	基因 Genes							
	RPL32	*RPS13*	*EF1*	*ACTB*	*RPS20*	18S rRNA	*GAPDH*	*TUB*
样本数 n	12	12	12	12	12	12	12	12
Geo 均值 Geo Mean [Cq]	18.04	18.15	17.54	16.81	18.55	17.83	21.10	21.38
AR 均值 AR Mean [Cq]	18.05	18.18	17.57	16.85	18.59	17.95	21.20	21.49
最小值 min [Cq]	16.18	16.80	16.61	15.84	16.70	16.13	16.75	16.97
最大值 max [Cq]	19.25	22.34	21.52	21.76	22.31	23.80	24.63	24.74
标准差 *SD* [± Cq]	0.45	0.64	0.74	0.82	0.84	1.61	1.63	1.86
变异系数 *CV* [% Cq]	2.52	3.52	4.19	4.84	4.53	8.94	7.70	8.64
x-fold 最小值 min [x-fold]	-3.62	-2.56	-1.91	-1.95	-3.59	-3.26	-20.49	-21.35
x-fold 最大值 max [x-fold]	2.32	18.16	15.75	30.87	13.56	62.55	11.55	10.24
x-fold 标准差 *SD* [± x-fold]	1.37	1.56	1.67	1.76	1.79	3.04	3.10	3.62
稳定性排序 Stability ranking	1	2	3	4	5	6	7	8

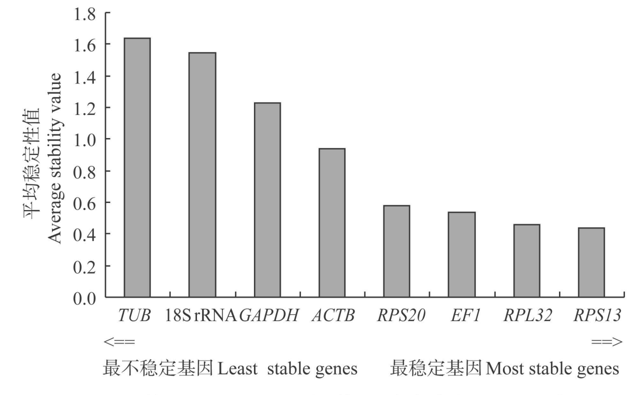


图 4 利用 NormFinder 评价 8 种内参候选基因在 Bt 毒素诱导后的小菜蛾中的稳定性

Fig. 4 Average expression stability values of the candidate reference genes in *Plutella xylostella* after exposure to Bt toxin analyzed by NormFinder

NormFinder 软件中稳定性值越低表示该基因表达越稳定。A lower stability value indicates more stable expression, as analyzed by the NormFinder software.

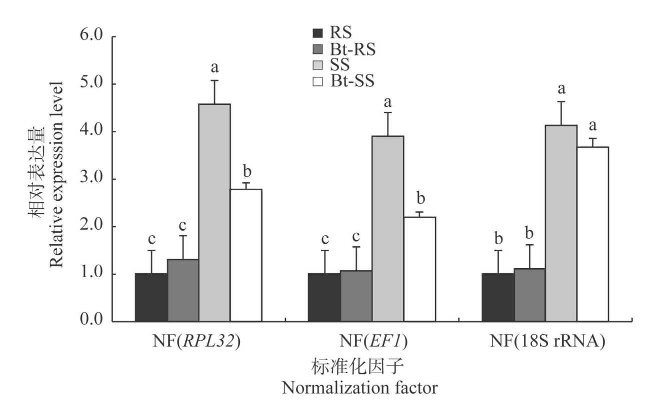


图 5 利用不同内参基因计算小菜蛾 *APN2* 在 Bt 毒素诱导前后的敏感品系和抗性品系中的表达水平

Fig. 5 The expression level of *APN2* in *Plutella xylostella* with and without exposure to Bt toxin by quantitative real-time PCR using different reference genes

RS：抗性品系 Resistant strain；SS：敏感品系 Susceptible strain；Bt-RS：Bt 诱导的抗性品系 Resistant strain after exposure to Bt toxin exposure；Bt-SS：Bt 诱导的敏感品系 Susceptible strain after exposure to Bt toxin. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同字母表示差异性显著($P < 0.05$，Tukey 氏检验)。Data in the figure are mean ± *SE*; different capital letters above bars mean significant difference ($P < 0.05$, Tukey's test).

18S rRNA，使用这 3 种内参基因分析了小菜蛾氨肽酶基因 *APN2* 分别在 Bt 毒素 Cry1Ac 诱导前后的敏感品系和抗性品系中的表达量，结果见图 5。由图可知，以 *RPL32* 作为内参基因，诱导前的敏感品系中 *APN2* 的相对表达量显著高于其他 3 种处理，诱导后的敏感品系中 *APN2* 的相对表达量显著高于诱导前的抗性品系中的相对表达量，而在诱导前后的抗性品系中相对表达量无显著差异。以 *EF1* 为内参基因，结果与内参基因 *RPL32* 一致。但是以稳定性较差的 18S rRNA 为内参基因，诱导前后的敏感品系中 *APN2* 的表达并无显著差异。因此使用不稳定内参基因可能导致实时荧光定量 PCR 的相对表达量分析结果的错误。

3　讨论

实时荧光定量 PCR 因其快速性、精确性和灵敏性，在研究基因表达水平方面得到广泛应用，然而适合稳定的内参基因的正确选择是保证其结果可靠性的前提条件(Bustin *et al*., 2005；VanGuilder *et al*., 2008；Derveaux *et al*., 2010)。目前，小菜蛾基因表达时常选用的内参基因包括 *GAPDH*，*ACTB* 和 18S rRNA(Du *et al*., 2005；Song *et al*., 2008；Yang *et al*., 2009)。但是，这些内参基因在某些试验条件下的表达差异较大，在进行实时荧光定量 PCR 试验之前需要对其稳定性重新评估。本研究根据文献报道，选择了 6 个在文献中小菜蛾使用过的内参基因,并挑选了 2 个从未在小菜蛾使用过的基因(*EF*1 和 *RPS*20)，对这 8 种候选内参基因在 Bt 毒素诱导后的小菜蛾中肠组织中的表达稳定性进行了探讨。结果表明小菜蛾新内参基因 *EF*1 表现了良好的稳定性，其结果与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*(Ponton *et al*., 2011)及蝗虫 *Chortoicetes terminifera*(Chapuis *et al*., 2011)基本一致，即 *EF*1 均被筛选为最合适内参之一。在此基础上，通过使用不同内参基因计算小菜蛾 APN2 基因表达水平，来验证所选内参基因的可靠性，结果表明以 *EF*1 作为内参，计算结果与稳定性较好的传统内参 *RPL*32 结果一致，但以 18S rRNA 为内参基因计算，却导致部分试验结果产生误差。

目前最常用的用于内参稳定性评价的 3 种软件分别是 geNorm，NormFinder 和 BestKeeper。本研究中 3 种软件结果基本一致，即 *RPS*13，*EF*1 和 *RPL*32 均排名靠前，表明有良好的稳定性，但 3 种基因具体排名因软件不同而有所差异。值得一提的是，geNorm 软件除了排序功能外，还有最适合内参基因数目选择的功能。越来越多研究者意识到实时荧光定量分析中使用一个内参往往不够，仍需增加至 2 ~ 3 个内参共同使用，以此来减少计算结果的系统误差(Radonić *et al*., 2004)。至于如何平衡 3 种软件的排序结果，也可借助其他软件或平台，如 RefFinder (http://www. leonxie. com/referencegene. php? type = reference)即是一款免费的 g 参评价网络平台，其整合了 geNorm，NormFinder 和 BestKeeper 等软件结果而得出一个最终综合排名结果。

内参基因的稳定性不是一成不变的，不仅与实验条件相关，亦与样本的组织有很大程度相关(吴家红等，2011；李俊等，2012)，不适合的内参基因的选择极有可能导致实时定量 PCR 实验最终结果的误差。因此，在进行实时定量 PCR 内参基因选择时，仅参考文献报道的内参基因远远不够，应进行仔细分析和评价所选内参基因在特定试验条件下的稳定性。随着小菜蛾更多新基因的发现，实时定量 PCR 将更广泛应用于这些新基因功能研究，本研究不仅对小菜蛾相关的基因表达分析中内参基因的选择提供了试验依据，也对其他昆虫内参基因筛选方法提供了一定的参考。

参考文献(References)

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft T, 2004. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*., 64: 5245 - 5250.

Bustin S, Benes V, Nolan T, Pfaffl M, 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J. Mol. Endocrinol*., 34: 597 - 601.

Chapuis MP, Tohidi-Estahani D, Dodgson T, Blondin L, Ponton F, Cullen D, Simpson S, Sword GA, 2011. Assessment and validation of a suite of reverse transcription-quantitative PCR reference genes for analyses of density-dependent behavioural plasticity in the Australian plague locust. *BMC Genomics*, 12: 7.

Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J, 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50: 227 - 230.

Du L, Li B, Gao L, Xue CB, Lin J, Luo WC, 2010. Molecular characterization of the cDNA encoding prophenoloxidase-2 (PPO2) and its expression in diamondback moth *Plutella xylostella*. *Pest Biochem. Physiol*., 98: 158 - 167.

Feng X, Li ZY, Wu QJ, Chen AD, Wu YD, Hou YM, He YY, Li JH, Xie SH, Zhang JM, Fu W, Ma CS, 2011. Research progress of the resistance management and sustainable control of diamondback moth (*Plutella xylostella*) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 247 - 253. [冯夏，李振宇，吴青君，谌爱东，吴益东，侯有明，何余容，李建洪，谢圣华，章金明，符伟，马春森，2011. 小菜蛾抗性治理及可持续防控技术研究与示范. 应用昆虫学报，48(2): 247 - 253]

He W, You M, Vasseur L, Yang G, Xie M, Cui K, Bai J, Liu C, Li X, Xu X, Huang S, 2012. Developmental and insecticide-resistant insights from the de novo assembled transcriptome of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Genomics*, 99: 169 - 177.

Li J, Wei HX, Li Y, Li QY, Li N, 2012. Identification of a suitable endogenous control gene in porcine blastocysts for use in quantitative PCR analysis of microRNAs. *Sci. China Life Sci*., 55: 126 - 131. [李俊，卫恒习，李燕，李秋艳，李宁，2012. 猪囊胚 microRNA 定量 PCR 分析中适宜内参基因的选择. 中国科学：生命科学，42(3): 203 - 208]

Pfaffl M, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*., 29: e45.

Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26: 509 – 515.

Ponton F, Chapuis M, Pernice M, Sword GA, Simpson SJ, 2011. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 57: 840 – 850.

Radonić A, Thulke S, Mackay I, Landt O, Siegert W, Nitsche A, 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 856 – 862.

Song KH, Jung MK, Eum JH, Hwang IC, Han SS, 2008. Proteomic analysis of parasitized *Plutella xylostella* larvae plasma. *J. Insect Physiol.*, 54: 1271 – 1280.

Talekar N, Shelton A, 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 275 – 301.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3: RESEARCH0034.

VanGuilder H, Vrana K, Freeman W, 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44: 619 – 626.

Wu JH, Cheng JZ, Sun Y, Chen L, 2011. Selection of control genes in Real-time qPCR analysis of gene expression in *Aedes albopictus*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 27(5): 432 – 435. [吴家红, 程金芝, 孙宇, 陈璐, 2011. 白纹伊蚊基因表达定量 PCR 内参基因的选择. 中国人兽共患病学报, 27(5): 432 – 435]

Yang ZX, Wen LZ, Wu QJ, Wang SL, Xu BY, Chang XL, Zhu GR, Zhang YJ, 2009. Effects of injecting cadherin gene dsRNA on growth and development in diamondback moth *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae). *J. Appl. Entomol.*, 133: 75 – 81.

（责任编辑：赵利辉）